

抗新型冠状病毒肺炎药物靶点的研究进展

邓卫宁¹, 王利娜^{2*}, 崔艳丽³

1. 西安医学院附属宝鸡医院 医学检验科, 陕西 宝鸡 721006

2. 天士力控股集团有限公司天士力研究院, 天津 300410

3. 天津药物研究院, 天津 300462

摘要: 自2019年12月以来, 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)在国内爆发, 并且目前已在日本和韩国等地进入高发态势, 该病毒导致的新型冠状病毒肺炎(COVID-19)已造成多人感染并有2 500余人死亡, 世界卫生组织于2020年1月31日宣布疫情为“国际关注的突发公共卫生事件”。抗新型冠状病毒药物是阻止病毒传播以及在宿主体内复制从而引起肺炎的有力武器。综述了抗COVID-19药物靶点以及相应的药物和候选物的研究进展。

关键词: 新型冠状病毒肺炎; 新型冠状病毒; 药物靶点

中图分类号: R974

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2020)03-0401-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.03.002

Research progress on drug targets of anti-corona virus disease 2019

DENG Wei-ning¹, WANG Li-na², CUI Yan-li³

1. Department of Laboratory Medicine, Baoji Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Baoji, Xi'an 721006, China

2. Tasly Academy, Tasly Holding Group. Co., Ltd., Tianjin 300410, China

3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

Abstract: The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has been in the high incidence since December 2019, and has been in high incidence in Japan and Korea. The corona virus disease 2019 (COVID-19) caused by the virus is likely to cause thousands of people infected and more than 2 500 deaths. On January 31, 2020, the World Health Organization declared the epidemic as Public Health Emergency of International Concern. Anti SARS-CoV-2 drugs are powerful weapons to prevent virus transmission and to cause pneumonia in hosts. Herein, the research progress of the anti SARS-CoV-2 drug targets and related drug candidates were summarized in this paper.

Key words: SARS-CoV-2; COVID-19; drug target

自2019年12月以来, 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)在全国多个地区快速传播, 截止2020年2月23日该病毒已导致全国感染77 000余人, 而国外其他地区感染人数已2 000余人, 该病毒导致的新型冠状病毒肺炎(COVID-19)已导致2 500余人死亡, 全球多地进入疫情紧急状态。发现高效的抗SARS-CoV-2药物以及用于SARS-CoV-2治疗的策略迫在眉睫。

SARS-CoV-2属于 β 属的新型冠状病毒, 有包膜, 颗粒呈圆形或椭圆形, 常为多形性, 直径为60~

140 nm。其基因特征与非典型肺炎冠状病毒(SARS-CoV)、中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)有明显区别^[1]。SARS-CoV-2病毒与以上两种病毒均属于正义、单链RNA病毒, 这3种冠状病毒具有非常相似的生命周期。刺突糖蛋白(S蛋白或spike蛋白)的S1亚基上的受体结合域(RBD)与宿主细胞表面的血管紧张素转化酶2(ACE2)之间的结合触发S蛋白的S2亚基发生构象变化, 导致病毒通过内吞作用进入宿主细胞^[2-3]。此外, 跨膜蛋白酶丝氨酸2(TMPS2)可以将S蛋白裂解为S1和

收稿日期: 2020-02-23

基金项目: 江苏省基础研究计划面上资助项目(BK20181209)

作者简介: 邓卫宁, 女, 主管检验师, 研究方向为临床微生物学。Tel: (0917)3619568 E-mail: 153813445@qq.com

*通信作者 王利娜, 女, 研究方向为化学药创新药物研发。Tel: (022)26731243 E-mail: wanglina430@tasly.com

S2 亚基, 助推病毒在细胞表面以非内吞作用途径进入细胞^[4]。SARS-CoV-2 病毒进入细胞后, 核衣壳与病毒自身的正义链 RNA 释放到细胞质中, 正义链 RNA 的开放阅读框 ORF1a 和 ORF1b 翻译产生非结构蛋白, 由木瓜蛋白酶样蛋白酶 (PLpro) 和主蛋白酶 (Mpro 或 3CLpro) 参与裂解, 最终产生包括螺旋酶 (Helicase) 和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp) 在内的非结构蛋白, 参与病毒转录、复制过程。最终由核衣壳蛋白和基因组 RNA 组装成新的病毒体通过胞吐作用释放到细胞外^[5]。在 SARS-CoV-2 跨膜进入宿主细胞的过程、在宿主细胞内的转录翻译、新病毒体的组装、释放过程中的关键蛋白均可作为抗 SARS-CoV-2 药物研发的靶点。本文以 SARS-CoV-2 感染宿主的生命周期为主线, 综述了抗 SARS-CoV-2 药物靶点以及针对靶点的药物研究状况。

1 阻止病毒进入宿主细胞的抗病毒药物靶点

阻断 SARS-CoV-2 通过内吞作用进入宿主细胞的过程, 该过程涉及的药物靶点有来自宿主的 ACE2 蛋白、TMPRSS2 和 AAK1, 以及来自 SARS-CoV-2 的 S 蛋白。

ACE2 广泛分布在人体各组织, 尤其在肺部含量较高。动物实验表明 ACE2 具有保护小鼠免受感染吸入或脓毒症引起的急性呼吸窘迫综合征^[6]。SARS 病毒感染时, ACE2 的水平明显下降^[7]。武汉病毒研究所的一项研究证实 ACE2 受体蛋白对于新型冠状病毒感染细胞是必需的^[8]。SARS-CoV-2 与 ACE2 蛋白受体直接作用的区域内存在大量非保守性突变。目前, S 蛋白-ACE2 相互作用的蛋白结构已经得到解析, 为疫苗和药物设计提供可靠的指导^[9]。针对 SARS-CoV-2 进入宿主细胞所必须的 S 蛋白与 ACE2 蛋白相互作用, 已有多个国内研究团队通过分子对接虚拟筛选方法以及人工智能药物筛选的方法发现了多种潜在的 ACE2 结合剂, 但目前暂未见到这些分子的活性试验数据。SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 的 S 蛋白序列相似度为 76%, 通过蛋白 S1 区域内的 RBD 与 ACE2 蛋白结合。griffithsin 是一种源自红藻的凝集素, 可与病毒糖蛋白表面上的寡糖结合, 已处于 I 期临床研究用于预防 HIV-1 感染, 但是否可作为 SARS-CoV-2 S 蛋白抑制剂亟待验证^[10]。茆莫司他在血液透析中被用作抗凝血剂, 是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 已被证明可通过阻止膜融合抑制 SARS-CoV-2 感染, 半最大效应浓度

(EC₅₀) 为 22.50 μmol/L^[11], 猜测起作用可能与 TMPRSS2 有关。SARS-CoV-2 是经由肺部 AT2 肺泡上皮细胞的 ACE2 受体通过内吞作用感染细胞的, 而 AAK1 是这个过程调节器; 阻断 AAK1 则有可能阻断病毒进入细胞过程。2020 年 2 月 4 日 Benevolent AI 公司报道, 借助深度学习和知识图谱发现 378 种 AAK1 潜在阻断剂, 其中有 47 种具有医学用途; 这些药物中有很多和肿瘤治疗相关, 如舒尼替尼、厄洛替尼等。这两种药物都通过抑制 AAK1 体现了对病毒感染的抑制作用^[5]。

2 阻断 SARS-CoV-2 RNA 复制过程的药物靶点

作为 RNA 病毒, 病毒自身编码的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 对病毒的 RNA 复制起关键作用, RdRp 抑制剂可作为抗 RNA 病毒的广谱抗病毒药物。RdRp 蛋白结构中有一个大而深的凹槽结构区作为 RNA 合成的活性中心。SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 的 RdRp 蛋白序列相似性高达 96%, 而且结构中的不同之处均存在于活性中心以外。因此, 高的序列保守性使得针对 SARS 病毒 RdRp 抑制剂的开发经验可以应用到抗新型冠状病毒药物的研发中^[12]。

利巴韦林、法匹拉韦是目前已上市的病毒 RdRp 抑制剂。体外研究结果显示 Vero E6 细胞模型中, 利巴韦林抗 SARS-CoV-2 病毒的 EC₅₀ 为 109.50 μmol/L, 细胞半数毒性浓度 (CC₅₀) 大于 400 μmol/L, 选择性指数 (SI) 大于 3.65, 活性较弱; 法匹拉韦的 EC₅₀ 为 61.88 μmol/L, CC₅₀ 大于 400 μmol/L, SI 大于 6.46。而之前关于埃博拉病毒的研究显示, 法匹那韦虽然在体外研究中 EC₅₀ 为 67 μmol/L, 但却在动物研究中能够 100% 的保护小鼠抵抗埃博拉病毒的感染, 因此值得进一步研究^[11]。评估法匹拉韦联用干扰素-α 的用法正在国内进行 III 期临床研究。此外, 瑞德西韦作为一种腺嘌呤衍生物的前药, 体外实验显示对 MERS-CoV、SARS-CoV 等 RNA 病毒具有广谱的抗病毒活性, 在 Vero E6 细胞中的 EC₅₀ 为 0.77 μmol/L; 2020 年 2 月初在国内启动的两项 III 期临床试验旨在评估针对 SARS-CoV-2 患者的瑞德西韦静脉注射, 估计完成日期为 2020 年 4 月。加利地韦也是一种 RNA 聚合酶抑制剂, 目前正处于 I 期临床研究预期用于埃博拉、寨卡病毒的治疗等; 临床前研究显示对 MERS-CoV、SARS-CoV 在内的许多 RNA 病毒具有抑制活性。

SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 的解旋酶即非结构

蛋白 13(nsp13), 利用 ATP 提供的能量水解核苷酸, 解旋核酸双链, 速率可达到 280 个碱基对/s, 其活性依赖于镁离子, 而 RdRp 可以增强解旋酶活性^[13]。2014 年密苏里大学的研究人员报道 SSYA10-001 对 SARS-CoV 解旋酶的 IC₅₀ 为 5.9 μmol/L, 在 Vero E6 细胞模型中抑制 MERS-CoV、SARS-CoV 的 EC₅₀ 分别为约 25、7 μmol/L, 对 SARS-CoV 病毒的显现出一定的抑制活性^[14]。

3 阻断 SARS-CoV-2 病毒蛋白生成的药物靶点

在病毒进入人体细胞后释放出的 RNA 直接与宿主的核糖体结合, 翻译出的病毒复制所需的蛋白酶。已知的 3 个关键蛋白酶分别为 3CLpro、PLpro^[15] 和 RNA 解旋酶, 目前均是抗 SARS-CoV-2 病毒的重要药物靶点。

SARS-CoV-2 和 SARS-nCoV 的 3CLpro 蛋白在氨基酸序列上有高达 96% 相似度^[12]。3CLpro 单体蛋白包含 N 端催化区域和 C 端区域, 一般以二聚体形式存在。2020 年 1 月 26 日, 饶子和和杨海涛团队快速表达并解析了 SARS-CoV-2 中 3CLpro 蛋白的结构 (PDB ID: 6LU7), 极大地促进了该类抑制剂的发现与研究^[6]。已报道众多的 HIV-1 蛋白酶抑制是潜在 3CLpro 抑制剂。抗 SARS-CoV-2 病毒的研究已处于 III 期临床阶段, 包括洛匹那韦 (NCT04252274、NCT04251871、NCT04255017、ChiCTR2000029539)、利托那韦 (NCT04251871、NCT04255017、NCT04261270) 以及达芦那韦考比司他固定剂量组合片 (NCT04252274)。另外, 歌礼制药公司的 3CLpro 抑制剂 ASC09F 与利托那韦组合用药在国内亦处于抗 SARS-CoV-2 的 III 期临床研究中 (NCT04261270)。

与 3CLpro 不同, SARS-CoV-2 与 SARS-nCoV 的 PLpro 只具有 83% 的序列相似性^[12]。但是形成活性位点的蛋白质高级结构在两个 PLpro 蛋白中并没有发生变化^[5]。因此, 针对 SARS-CoV 病毒的 PLpro 开发的抑制剂可能也适用于 SARS-CoV-2^[7]。国内已有团队通过虚拟筛选的方法找到 PLpro 潜在抑制剂, 但目前均未得到实验证实。有报道显示在体外实验中双硫仑是 MERS-CoV、SARS-CoV 中 PLpro 的慢结合竞争性抑制剂, 因此也具有抑制 SARS-CoV-2 病毒 PLpro 的潜在价值^[16]。GRL-0617 是一个合成小分子 PLpro 抑制剂, 在抗 SARS-CoV 病毒的 Vero E6 显示 IC₅₀、EC₅₀ 和 CC₅₀ 值分别为 0.35、9.5 和 >100 nmol/L; 在 HEK293 细胞中的 CC₅₀ 值大

于 100 nmol/L^[17]。Lee 等^[18]通过高通量筛选与分子模拟结合, 从 30 000 个化合物中筛选得到 MERS-CoV 病毒的 PLpro 抑制剂, 最优化化合物的活性 IC₅₀ 达到 (20.0±2.8) μmol/L。这些化合物均可作为 SARS-CoV-2 PLpro 抑制剂进一步研究。

4 作用于其他环节的抗病毒药物靶点

除了与 SARS-CoV-2 以上生命周期相关的抗病毒药物靶点以外, 其他一些抗 RNA 病毒的药物靶点也显现出作为抗 SARS-CoV-2 药物靶点的潜力。

前期 SARS-CoV 病毒的研究显示在病毒 mRNAs cap 甲基化是病毒逃避免疫系统的关键环节。SARS-CoV-2 非结构蛋白 10、16 (nsp16、nsp10) 共同参与这一甲基化过程, nsp16 为甲基转移酶 (2'-O-MTase) 的主体, 介导 2'-O-核糖甲基化到病毒 mRNAs 的 5'-cap 结构。nsp10 具有激活因子的作用, 帮助 nsp16 结合甲基供体分子 SAM 和“加帽”的 RNA 底物, 底物 SAM 结合口袋为抗病毒药物开发提供机会。目前, nsp16、nsp10 复合物晶体结构已经得到解析, 尚未有该方面的分子报道^[19]。

2019 年王冬音^[20]的研究显示穿心莲中主要成分穿心莲内酯通过干扰肠道病毒 71 (EV-71) 内涵体的酸化成熟过程, 抑制病毒脱壳, 从而使能进行有效复制的病毒减少, 起到抑制病毒的作用; 并且发现对 EV-D68 病毒原型株和流行株均有显著的抑制作用, 说明该机制存在一定普适性。沈阳药科大学课题组通过计算机虚拟筛选研究显示, 穿心莲内酯对 S 蛋白酶切位点也有很高的亲和力。穿心莲内酯作为抗菌抗病毒药物已使用多年, 其抗 SARS-CoV-2 病毒活性值得深入研究。

以上研究为抗 SARS-CoV-2 药物以及抗其他 RNA 病毒药物的研发提供新的思路。

5 结语

在 SARS-CoV-2 引发的疫情快速传播的两个月以来, 已有多个药物以增加适应症的方式开展抗 SARS-CoV-2 的临床研究, 以氯喹/羟氯喹、瑞德西韦和阿比多尔为代表的化合物已经展现出一定的治疗价值。并且有多个已上市的药物作为候选药物在进行体外和体内的抗 SARS-CoV-2 研究, 期望发现更加高效的抗病毒药物。本文综述了近期文献中报道的抗 SARS-CoV-2 药物靶点以及抗病毒化合物, 期望为该类药物研究提供参考。

参考文献

[1] 新型冠状病毒肺炎诊疗方案 (试行第六版) [EB/OL].

- (2020-02-19) [2020-02-24]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202002/8334a8326dd94d329df351d7da8aefc2.shtml?from=timeline>.
- [2] Dong N, Yang X, Ye L, *et al*. Genomic and protein structure modelling analysis depicts the origin and infectivity of 2019-nCoV, a new coronavirus which caused a pneumonia outbreak in Wuhan, China [J]. *bioRxiv*, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.01.20.913368>.
- [3] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Krüger N, *et al*. The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells [J]. *bioRxiv*, 2020; DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.01.31.929042>.
- [4] Richardson P, Griffin I, Tucker C, *et al*. Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): e30-e31.
- [5] Ju J Y, Kumar S, Li X X, *et al*. Nucleotide analogues as inhibitors of viral polymerases [J]. *bioRxiv*, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.01.30.927574>.
- [6] Imai Y, Kuba K, Rao S, *et al*. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure [J]. *Nature*, 2005, 436(7047): 112-116.
- [7] Kuba K, Imai Y, Rao S, *et al*. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury [J]. *Nat Med*, 2005, 11(8): 875-879.
- [8] Zhou P, Yang X L, Wang X G, *et al*. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin [J]. *bioRxiv*, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.01.22.914952>.
- [9] Wrapp D, Wang N, Corbett K S, *et al*. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation [J]. *Science*, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.02.11.944462>.
- [10] Li G, De Clercq E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, DOI: 10.1038/d41573-020-00016-0.
- [11] Wang M, Cao R, Zhang L, *et al*. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) *in vitro* [J]. *Cell Res*, 2020, DOI: 10.1038/s41422-020-0282-0.
- [12] Morse J S, Lalonde T, Xu S Q, *et al*. Learning from the past: possible urgent prevention and treatment options for severe acute respiratory infections caused by 2019-nCoV [J]. *Chem Rxiv*, DOI: <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.11728983.v1>.
- [13] Adedeji A O, Marchand B, Velthuis A J, *et al*. Mechanism of nucleic acid unwinding by SARS-CoV helicase [J]. *PLoS One*, 2012, 5(7): e36521.
- [14] Adedeji A O, Singh K, Kassim A, *et al*. Evaluation of SSYA10-001 as a replication inhibitor of severe acute respiratory syndrome, mouse hepatitis, and middle east respiratory syndrome coronaviruses [J]. *Antim Agents Chemoth*, 2014, 58(8): 4894-4898.
- [15] Báez-Santos Y M, St John S E, Mesecar A D. The SARS-coronavirus papain-like protease: structure, function and inhibition by designed antiviral compounds [J]. *Antiviral Res*, 2015, 115: 21-38.
- [16] Lin M H, Moses D C, Hsieh C H, *et al*. Disulfiram can inhibit MERS and SARS coronavirus papain-like proteases via different modes [J]. *Antiv Res*, 2018, 150: 155-163.
- [17] Cortellis. [EB/OL]. (2020-02-24) [2020-02-24]. <https://www.cortellis.com/intelligence>.
- [18] Lee H, Ren J, Pesavento R P, *et al*. Identification and design of novel small molecule inhibitors against MERS-CoV papain-like protease via high-throughput screening and molecular modeling [J]. *Bioorg Med Chem*, 2019, 27(10): 1981-1989.
- [19] Chen Y, Su C, Ke M, *et al*. Biochemical and structural insights into the mechanisms of SARS coronavirus RNA ribose 2'-O-methylation by nsp16/nsp10 protein complex [J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(10): e1002294.
- [20] 王冬音. 穿心莲内酯抑制肠道病毒 D68 复制的作用机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2019.